

Aus der Frauenklinik mit Poliklinik
und Hebammenschule
der Universität Erlangen-Nürnberg

DER EINFLUSS VERSCHIEDENER PROTEKTIVER SUBSTANZEN AUF DIE QUALITÄT DES MENSCHLICHEN KRYOSPERMAS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Jürgen Albert Karl Mahner
aus Waldsassen

1976 № 4 14

Aus der Frauenklinik mit Poliklinik
und Hebammenschule
der Universität Erlangen - Nürnberg

**DER EINFLUSS VERSCHIEDENER
PROTEKTIVER SUBSTANZEN
AUF DIE QUALITÄT DES
MENSCHLICHEN KRYOSPERMAS**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Jürgen Albert Karl Mahner
aus Waldsassen

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. K.-G. Bregulla

Korreferent: Prof. Dr. K.-G. Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 16. August 1976

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543124_0050

Inhaltsübersicht

	Seite
Einleitung	1
Methodik	3
Ergebnisse und Diskussion	6
Zusammenfassung	18
Literaturverzeichnis	19
Biografische Daten	20

EINLEITUNG

Die Gefrierkonservierung menschlichen Samens ist seit Anfang der 60er-Jahre eine Routinemethode (1). Ihren Wert hat die Sperma-Kryokonservierung bei der Behandlung der sterilen Ehe bewiesen. Andere Indikationen, etwa die Poolung des Samens von Soldaten oder Männern, die einer Gefährdung durch radioaktive Strahlen ausgesetzt sind, sprechen für das Verfahren der Gefrierkonservierung (7, 8).

Wenn man die Entwicklung in der Veterinärmedizin, soweit sie die Kryospermakonservierung betrifft, mit der in der Humanmedizin vergleicht, so ergaben sich große Unterschiede. Innerhalb eines Jahrzehnts sind eine Fülle von Arbeiten über das tierische Kryosperma publiziert worden. Letztlich war man immer bemüht, die Qualität des Kryospermats und damit das Befruchtungsergebnis bei den Inseminationen zu verbessern. In der Humanmedizin hat sich nach den Angaben von BEHRMAN, SAWADA, SHERMAN und TYLER für die Gefrierkonservierung des Samens nur wenig geändert. Die technisch einfachere und finanziell nicht so aufwendige Aufarbeitung des Spermas in Pailletten oder Pellets in temperaturkonstanten Gefrierzonen wird nur von wenigen genutzt (2, 9). Während mit diesen technischen Modifikationen bei der Kryokonservierung der Einfrierprozeß einfacher wurde, blieb die Qualität des Kryospermats weitgehend unverändert. Die Verdüner von NAGASE

und CARLBORG sind im Vergleich zu dem von BEHRMAN und SAWADA angegebenen protektiven Gemisch günstiger. Die Motilitätsraten homogen eingefrorener Ejakulate haben das gezeigt (3). Alle Verdünner enthielten als Schutzstoff Glycerin. Vergleichende Untersuchungen verschiedener protektiver Substanzen an homogen aufgearbeiteten Ejakulaten für die Gefrierkonservierung fehlen bis jetzt. Es schien deshalb sinnvoll, die Stoffe, die benutzt werden, um Zellen oder Zellverbände einzufrieren, in verschiedenen Konzentrationen unter reproduzierbaren Bedingungen zu testen, um bei einem positiven Ergebnis für die Zusammenstellung eines Mediums günstige Daten zu berücksichtigen. Als Schutzstoffe wurden Glycerin, Dimethylsulfoxyd und Polyvinylpyrrolidon untersucht (1, 4, 5, 6).

METHODIK

3 verschiedene Einfriermedien, in denen Glycerin (Medium I), Dimethylsulfoxyd (Medium II) und Polyvinylpyrrolidon (Medium III) in 5 bzw. 7 verschiedenen Konzentrationen vorlagen, wurden auf ihre Schutzfunktion bei der Gefrierkonservierung menschlichen Samens überprüft. Als Parameter galt die Ausgangs- und Endmotilität der Spermien. Bei dem Medium I handelte es sich um einen von BEHRMAN und SAWADA beschriebenen Verdünner. Das Glycerin war in diesem Medium in einer Konzentration von 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 20 und 30 Vol. % enthalten.

Das Medium II bestand in einer 0,5, 1, 2, 3, 6 molaren Lösung von Dimethylsulfoxyd. Als Lösungsmittel diente isotone Ringerlösung.

Im Medium III war in einer Ringerlösung Polyvinylpyrrolidon unterschiedlich konzentriert. Die Lösungen waren auf 0,5, 1, 2, 3 und 4-fache Isotonie eingestellt.

In den Versuch kamen 15 unausgesuchte Ejakulate. Spender waren Studenten im Alter von 21 bis 27 Jahren. Bei einem Ejakulatvolumen von 1 bis 4,5 ml schwankte die Zahl der Spermien von 10 bis 190 Mill./ml, die Motilität in einem Bereich von 35 bis 90 %. Die Probanden hatten eine durchschnittlich 2 bis 3-tägige Karenzzeit eingehalten. Für die Untersuchung wurden die Ejakulate nach der Verflüssigung nach andrologischen

Kriterien grob beurteilt; das Ejakulatvolumen, die Zellzahl und die Motilität bestimmt. Mit den Medien I, II und III kamen je 5 Ejakulate zusammen. Für die Testung der unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Medien konnte die Spermaportion so geteilt werden, daß sich Minipailletten^{*)} mit einem Volumen von 0,1 ml abfüllen ließen. Im Durchschnitt ließen sich 10 Pailletten für jede Konzentrationsstufe füllen. Die mit einem Polyvinylalkoholpuder verschlossenen Pailletten kamen ohne Adaptationszeit zum Einfrieren. Die Abkühlraten in einer Gefrierkammer^{**)} entsprachen dem Verfahren von BEHRMAN und SAWADA: von +22°C auf +2°C Abkühlung 1°C/min., von +2°C auf -20°C 5°C/min. und von -20°C auf -80°C 10°C/min. Nach Erreichen von -80°C wurden die Pailletten direkt in flüssigen Stickstoff umgelagert. Die Pailletten waren durch verschiedene Farben und ihr Einsetzen in verschiedenfarbige Köcher markiert. Die Lagerungsdauer in den Stickstoffcontainern betrug im Durchschnitt 1 bis 2 Wochen.

Für die Bestimmung der Endmotilität wurden die Pailletten in einem Inkubator bei +37°C Lufttemperatur aufgetaut. Der in den Tabellen angegebene Wert der Endmotilität ist jeweils ein Mittelwert aus 3 Motilitätszählungen jeder einzelnen Paillette.

*) Instruments de medicine veterinaire, Rue Clemenceau, 61 L'Aigle, France

**) Typ BF 2, Union Carbide Corporation, New York/USA

Die Tabellen 1 - 3 enthalten die Daten der Ausgangs- (AM) und Endmotilität (EM). Um die einzelnen Ejakulate in ihrem Motilitätsverhalten gegenüber den getesteten protektiven Medien richtig einschätzen zu können, ist die Angabe der Recovery-Werte notwendig. Das ist die Endmotilität bezogen auf eine Ausgangsmotilität von 100 %.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für das Medium I mit unterschiedlichen Glycerin-Konzentrationen zeigen die Tabellen A - E das Verhalten der Spermienmotilität bei der Kryokonservierung.

Sp = Spender

AM = Ausgangsmotilität

Z = Spermienzahl / Mill.

EM = Endmotilität

Rc = Recoveryrate

Tabelle 1

Sp	A			AM 65		Z 25	
OK	2,5	5	7,5	10	12,5	30	
EM	3,3	6,5	6,7	3,5	6,5	8,6	
Rc	5,1	8,5	10,3	6,4	8,5	12,3	

Sp	B			AM 65		Z 100	
OK	2,5	5	7,5	10	12,5	30	
EM	5	11,5	18,5	14,7	15,7	12,6	
Rc	13,3	19,3	30,7	24,4	22,7	18	

Sp C		AM 75			Z 24		
GK	2,5	5	7,5	10	12,5		
EM	13,7	28,1	35,5	10	7,1		
Rc	19,6	40,2	50,8	14,3	10,2		

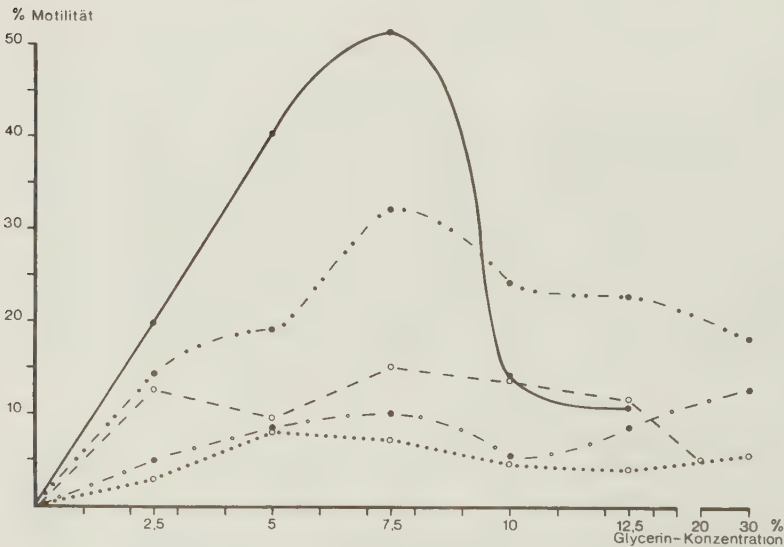
Sp D		AM 55			Z 50		
GK	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20
EM	9,4	7,3	11,3	10,1	9,0	3,6	3,5
Rc	12,5	9,7	15	13,4	12	5,1	5,0

Sp E		AM 35			Z 12		
GK	2,5	5	7,5	10	12,5	30	
EM	1,1	3,0	2,5	2,2	1,5	1,4	
Rc	3,1	8,6	7,2	6,3	4,3	5,6	

Nach der Auswertung der Tabellen besteht gar kein Zweifel daran, daß die günstigsten Konzentrationen für die Kryokonservierung zwischen 5 und 10 % in dem benutzten Verdünner liegen. Markant läßt sich das mit der grafischen Darstellung Abb. 1 zeigen.

Abb. 1

Abhängigkeit der Spermienmotilität von der Glycerin-Konzentration des protektiven Mediums.



Bei unterschiedlichen Recoveryraten zeigen sich die günstigsten Einfrierergebnisse in einem Bereich zwischen 5 und 10 % der Glycerin-Konzentration im verwandten protektiven Medium.

Im Medium II wurde als Schutzstoff Dimethylsulfoxyd verwendet. In den Tabellen 2 F - K sind wieder die Daten für die Zellzahl, Ausgangsmotilität, Endmotilität, Recoveryrate und die Molarität der Lösungen angegeben.

Tabelle 2

Sp	F	AM 60		Z 147	
DK	0,5	1	2	3	6
EM	5,1	8	1,8	0,17	0
Rc	8,7	13,6	3,1	0,3	0

Sp	G	AM 90		Z 166	
DK	0,5	1	2	3	6
EM	8,7	11,3	1,1	0,3	0
Rc	9,6	12,4	1,2	0,3	0

Sp H	AM 60			Z 33	
DK	0,5	1	2	3	6
EM	5,3	11,3	1,7	0,3	0
Rc	9,0	19,2	2,9	0,5	0

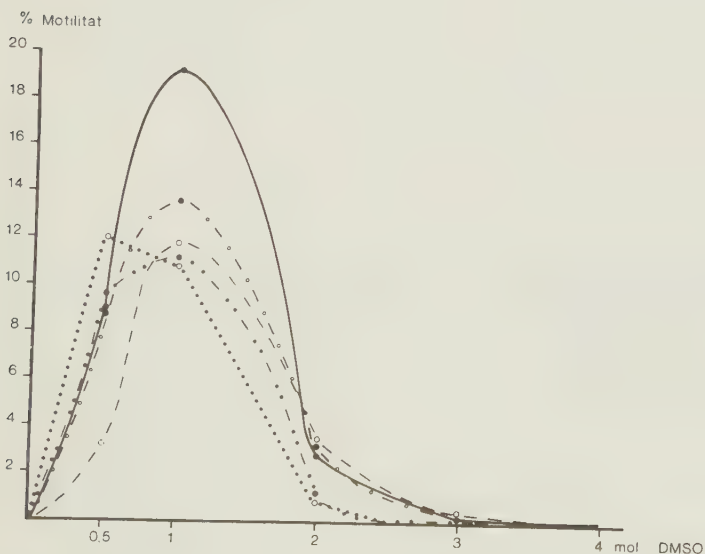
Sp J	AM 70			Z 18	
DK	0,5	1	2	3	6
EM	3,7	8,4	2,4	0,17	0
Rc	5,2	11,8	3,4	0,2	0

Sp K	AM 80			Z 10	
DK	0,5	1	2	3	6
EM	9,6	8,8	0,8	0,1	0
Rc	12,0	11,0	0,9	0,13	0

Die besten Überlebensraten für das Kryosperma lassen sich mit Dimethylsulfoxyd-Konzentrationen von 1 Mol. erreichen. Im Vergleich zum Glycerin sind die Überlebensraten aber wesentlich niedriger. Abbildung 2 zeigt das.

Abbildung 2

Abhängigkeit der Spermienmotilität von der DMSO-Konzentration des protektiven Mediums.



Die Recoverywerte verschiedener Ejakulate zeigen einheitlich optimale Größen bei Konzentrationen um 1 mol DMSO.

Für das III. Medium ergeben sich bei unterschiedlichen Polyvinylpyrrolidon-Konzentrationen die in den Tabellen 3 L - P angegebenen Werte.

(PK = 0,5, 1, 2, 3, 4-fache Isotonie)

Tabelle 3

Sp L	AM 80				Z 10
PK	0,5	1	2	3	4
EM	0	0	0	0	0
Rc	0	0	0	0	0

Sp M	AM 75				Z 110
PK	0,5	1	2	3	4
EM	0	0	0	0	0
Rc	0	0	0	0	0

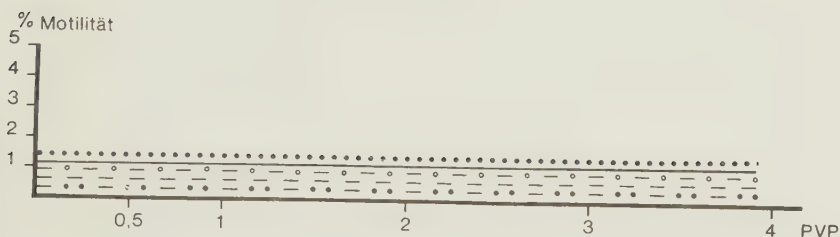
Sp N	AM 75				Z 27
PK	0,5	1	2	3	4
EM	0	0	0	0	0
Rc	0	0	0	0	0

Sp O	AM 75				Z 21
PK	0,5	1	2	3	4
EM	0	0	0	0	0
Rc	0	0	0	0	0

Sp P	AM 80				Z 190
PK	0,5	1	2	3	4
EM	0	0	0	0	0
Rc	0	0	0	0	0

Abhängigkeit der Spermienmotilität bei der Kryokonservierung vom protektiven Stoff Polyvinylpyrrolidon.

Abbildung 3



Die Schutzfunktion des Polyvinylpyrrolidons war mit dem benutzten Medium völlig unzureichend. Die grafische Darstellung Abb. 3 zeigt die fast vollständige Aufhebung der Motilität durch den Versuch der Kryokonservierung mit dem Schutzstoff PVP. Ein Einfluß auf die Motilitätsrate durch unterschiedliche PVP-Konzentrationen ist nicht nachweisbar.

Diese Ergebnisse lassen keinen Zweifel daran, daß sich Glycerin, Dimethylsulfoxyd und Polyvinylpyrrolidon für die Kryokonservierung menschlichen Samens nur sehr unterschiedlich eignen. Das Glycerin ist dem Dimethylsulfoxyd sicher überlegen, das Dimethylsulfoxyd wiederum dem Polyvinylpyrrolidon. Die statistische Sicherung^{*)} ist möglich. Bei der Berechnung der zu den jeweiligen Kurvenpunkten gehörenden Flächenintegrale und deren Summenfunktion ergeben sich deutliche Maxima. Die Überprüfung signifikanter Unterschiede bei den Recoveryraten gelingt mit dem Friedmann-Test.

$$\text{Bei der Prüfgröße } V = \frac{12}{r \cdot k (k + 1)} \cdot \sum R_j^2 - 3r (k + 1)$$

r = Anzahl der Ejakulate
 k = Anzahl der Verfahren

ergibt sich für Medium I:

V ist χ^2 verteilt mit $k-1$ Freiheitsgraden (FG). V_I ist gleich 10,7. Der Tafelwert χ^2 FG = 4 beträgt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 1\%$ 13,28, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 5\%$ 9,49. Der letzte Wert wird von der Prüfgröße V_I überschritten, d. h. bei relativ geringer Irrtumswahrscheinlichkeit bestehen auffallende Unterschiede zwischen den einzelnen Recoveryraten.

*) Herrn Dr. rer. nat. G. Hommel vom Institut für medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Erlangen-Nürnberg (Leiter: Prof. Dr. L. Horbach) danke ich für die Unterstützung bei der Statistik.

Im Hinblick auf die im Rang-Test erhaltenen Rangsummen (siehe Tab. 4) steht das Medium mit einer 7,5 %igen Glycerinkonzentration als Verdünner an der ersten Stelle vor den anderen Gemischen. Bei Auswertung einer größeren Anzahl von Verfahren kann damit gerechnet werden, daß der Tafelwert $X^2_{FG} = (k-1)$ für $\alpha \leq 1\%$ von der Prüfgröße überschritten wird und die Unterschiede der Recoveryraten signifikant werden.

Für das Medium mit dem DMSO überschreitet die Prüfgröße V_{II} mit ihrem errechneten Wert von 19,36 deutlich den Tafelwert $X^2_{FG} = 4$ von 13,28 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 1\%$. Damit gibt es zwischen den Recoveryraten signifikante Unterschiede. Das Optimum der Dimethylsulfoxyd-Konzentration im Verdünner wäre die 1-molare Lösung, wie sich auch aus dem entsprechenden Rangtest ersehen läßt (siehe Tab. 5).

Der Vergleich der mit Glycerin und DMSO aufgearbeiteten Ejakulate ist nur bedingt möglich. Für beide Verdünner wurden jeweils 5 Ejakulate verschiedener Spender und unterschiedlicher Qualität genommen. Diese Anzahl ist für eine sichere Aussage, um die bessere protektive Substanz zu formulieren, sicher nicht ausreichend, zumindest läßt sich aber eine Tendenz erkennen.

Tabelle 4

GK Sp	2,5		5		7,5		10		12,5	
	Rc	R	Rc	R	Rc	R	Rc	R	Rc	R
A	5,1	1	8,6	4	10,3	5	5,4	2	3,1	3
B	13,3	1	19,3	2	30,7	5	24,4	4	8,6	3
C	19,6	3	40,2	4	50,8	5	14,3	2	7,2	1
D	12,5	3	9,7	1	15	5	13,4	4	6,3	2
E	3,1	1	8,6	5	7,2	4	6,3	3	4,3	2
Rang- summen		9		16		24		15		11

Tabelle 5

DK \ Sp	0,5		1		2		3		6	
	Rc	R	Rc	R	Rc	R	Rc	R	Rc	R
F	8,7	4	13,6	5	3,1	3	0,3	2	0	1
G	9,6	4	12,4	5	1,2	3	0,3	2	0	1
H	9,0	4	19,2	5	2,9	3	0,5	2	0	1
I	5,2	4	11,8	5	3,4	3	0,2	2	0	1
K	12,0	5	11,0	4	0,83	3	0,13	2	0	1
Rang- summen	21		24		15		10		5	

ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß verschiedener protektiver Substanzen bei der Kryokonservierung menschlicher Ejakulate wurde untersucht. Als Schutzstoffe wurden Glycerin, Dimethylsulfoxyd und Polyvinylpyrrolidon in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Bei einem Vergleich dieser drei Substanzen scheint das Glycerin für die Kryokonservierung in einer Konzentration von 7,5 % im Verdünner am günstigsten. Die Ergebnisse für das Dimethylsulfoxyd zeigen ein Optimum für eine 1-molare Lösung. Das Polyvinylpyrrolidon scheint unbrauchbar.

Bei einem Vergleich der Endmotilität des Kryospermas bietet das Glycerin die meisten Vorteile. Da für die Gefrierkonservierung aber viele Variable entscheidend sind, kann diese Aussage nur für die hier beschriebenen Versuchsbedingungen gelten.

1. BEHRMAN, S. J.,
Y. SAWADA: Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator.
Fertil. Steril. 17, 457 (1966).
2. BREGULLA, K.,
U. M. Boquoi: Untersuchungen zur Tiefkühlkonservierung des menschlichen Samens.
Arch. Gynäk. 212, 323 (1972).
3. HERPANTIDOU, S.: Ein Vergleich der Verdünner von Behrman-Sawada, Carlborg und Nagase für die Kryokonservierung menschlicher Ejakulate in Pelletform.
Dissertation Erlangen 1976.
4. MATHESON, G. W.,
L. CARLBORG,
C. GEMZELL: Frozen human semen for arteficial insemination.
Amer. J. Obstet. Gynec. 104, 495 (1969).
5. NAGASE, A.,
E. F. GRAHAM: Pelleted semen: Comparison of different extenders and processes on fertility of bovine spermatozoa.
V. Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Trento 4, 387 (1964).
6. SAWADA, Y.,
M. C. CHANG: Motility and Fertilizing Capacity of Rabbit Spermatozoa after Freezing in a Medium Containing Demethyl Sulfoxyde.
Fertil. Steril. 15, 222 (1969).
7. SHERMAN, J. K.: Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: State of the art of human semen banking.
Fertil. Steril. 24, 397 (1973).
8. TYLER, F.: The clinical use of frozen semen banks.
Fertil. Steril. 24, 413 (1973).
9. VASTERLING, H. W.: Die künstliche Besamung beim Menschen. In: Paufler, S.K. u. Mitarb., Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Band I, 156-186.
Hannover: M. & H. Schaper 1974.

BIOGRAFISCHE DATEN

Name: Jürgen Mahner

Geburtsdatum: 7. Juni 1951 in 8595 Waldsassen

Schule: 1957 - 1961 Volksschule/Waldsassen
1961 - 1970 Naturwissenschaftliches Gymnasium
Tirschenreuth

Studium: 1970, Medizin, Universität Erlangen-Nürnberg
1973 Physikum
1976 Ärztliche Prüfung (05.08.1976)

Erlangen, im August 1976

Jürgen Albert Karl M a h n e r

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197